



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 102 21 055 A 1

51 Int. Cl. 7:
C 08 B 37/08

21 Aktenzeichen: 102 21 055.1
22 Anmeldetag: 10. 5. 2002
43 Offenlegungstag: 27. 11. 2003

DE 102 21 055 A 1

71 Anmelder:
Hemoteg GmbH, 52146 Würselen, DE

74 Vertreter:
Arth, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 82152
Planegg

72 Erfinder:
Hoffmann, Michael, 52249 Eschweiler, DE; Horres,
Roland, 52223 Stolberg, DE; Faust, Volker, 52080
Aachen, DE; Linßen, Marita Katharina, 52066
Aachen, DE

56 Entgegenhaltungen:
DE 197 24 869 C2
WO 86/05 789 A1
WO 00/43 120 A1
Carbohydrate Research, 1997, 300, 69-76;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren zur hämokompatiblen Beschichtung von Oberflächen

57 Die Erfindung betrifft die Verwendung von Oligo- und/oder Polysacchariden, welche den Zuckerbaustein N-Acetylglucosamin enthalten, für die Herstellung hämokompatibler Oberflächen sowie Verfahren zur hämokompatiblen Beschichtung von Oberflächen mit diesen Oligo- und/oder Polysacchariden, welche die gemeinsame biosynthetische Vorläufersubstanz von Heparin und Heparansulfaten imitieren. Des weiteren beschreibt die Erfindung Verfahren zur Herstellung dieser Oligo- und/oder Polysaccharide und offenbart diverse Verwendungsmöglichkeiten von hämokompatibel beschichteten Oberflächen.

DE 102 21 055 A 1

[0001] Die Erfindung betrifft die Verwendung von Oligo- und/oder Polysacchariden, enthaltend den Zuckerbaustein N-Acetylglucosamin für die Herstellung hämokompatibler Oberflächen, Verfahren zur hämokompatiblen Beschichtung von Oberflächen mit diesen Oligo- und/oder Polysacchariden sowie die Verwendung der hämokompatibel beschichteten Oberflächen.

[0002] Im menschlichen Körper kommt das Blut nur im Falle einer Verletzung mit anderen Oberflächen in Kontakt als der Innenseite von natürlichen Blutgefäßen. Daher wird das Blutgerinnungssystem immer dann aktiviert, wenn Blut mit fremden Oberflächen in Kontakt kommt, um die Blutung zu stillen und einen lebensbedrohlichen Blutverlust zu verhindern. Da ein Implantat ebenfalls eine fremde Oberfläche darstellt, werden alle Patienten, die ein Implantat erhalten, das dauerhaft mit Blut in Kontakt steht, für die Dauer des Blutkontaktes mit Medikamenten behandelt, mit sogenannten Antikoagulantien, welche die Blutgerinnung unterdrücken. Dies gilt ebenso für Patienten, bei denen eine extrakorporale Zirkulation angewendet wird, wie zum Beispiel Hämodialysepatienten. Diese gerinnungsunterdrückende Medikation ist jedoch mit zum Teil erheblichen Nebenwirkungen behaftet, die von Haarausfall, Nausea und Erbrechen über Thrombozytopenie, hämorrhagischen Hautnekrosen und erhöhter Blutungsneigung bis zu tödlich verlaufenden Nebenwirkungen wie beispielsweise Hirnblutungen reichen.

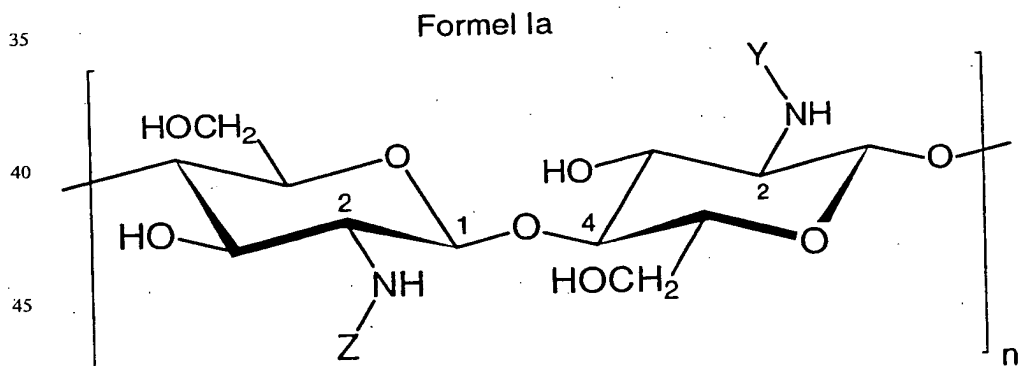
[0003] Somit besteht ein Bedarf an nicht-thrombogenen, hämokompatiblen Werkstoffen, beispielsweise Organersatzteilen, Membranen, Kanülen, Schläuchen, Blutbehältern usw., welche bei Blutkontakt nicht das Gerinnungssystem auflösen und zur Koagulation des Blutes führen.

[0004] EP-B-0 333 730 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung hämokompatibler Substrate durch Einarbeitung, Adhäsion und/oder Modifizierung und Verankerung von nicht-thrombogenem Endothelzelloberflächen-Polysaccharid (HS I). Die Immobilisierung dieses spezifischen Endothelzelloberflächen-Proteoheparansulfats HS I auf biologischen oder künstlichen Oberflächen bewirkt, daß derartig beschichtete Oberflächen blutverträglich werden und für den dauerhaften Blutkontakt geeignet sind. Nachteilig ist hingegen, daß dieses Verfahren für die Gewinnung von HS I die Kultivierung von Endothelzellen voraussetzt, so daß die wirtschaftliche Verwertbarkeit dieses Verfahrens stark eingeschränkt ist, da die Kultivierung von Endothelzellen zeitaufwendig ist und größere Mengen an kultivierten Endothelzellen nur mit immensem Kostenaufwand erhältlich sind.

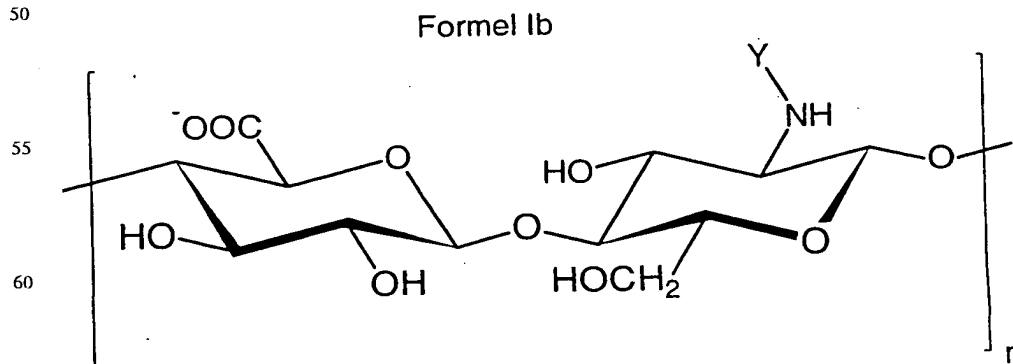
[0005] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Substanzen für die hämokompatible Beschichtung von Oberflächen sowie Verfahren zur hämokompatiblen Beschichtung von Oberflächen zur Verfügung zu stellen.

[0006] Diese Aufgabe wird durch die technische Lehre der unabhängigen Ansprüche der vorliegenden Erfindung gelöst. Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen, der Beschreibung, den Figuren sowie den Beispielen.

[0007] Die vorliegende Erfindung offenbart Polysaccharide der allgemeinen Formel Ia



sowie strukturell sehr ähnliche Polysaccharide der allgemeinen Formel Ib



65 [0008] Die Polysaccharide gemäß Formel Ia weisen Molekulargewichte von 2 kD bis 400 kD auf, bevorzugt von 5 kD bis 150 kD, mehr bevorzugt von 10 kD bis 100 kD und insbesondere bevorzugt von 30 kD bis 80 kD. Die Polysaccharide gemäß Formel Ib weisen Molekulargewichte von 2 kD bis 15 kD auf, bevorzugt von 4 kD bis 13 kD, mehr bevorzugt von 6 kD bis 12 kD und insbesondere bevorzugt von 8 kD bis 11 kD. Die Variable n ist eine ganze Zahl im Bereich von 4

bis 1050. Bevorzugt ist n eine ganze Zahl von 9 bis 400, mehr bevorzugt von 14 bis 260 und insbesondere bevorzugt eine ganze Zahl zwischen 19 und 210.

[0009] Die allgemeine Formel Ia und Ib gibt ein Disaccharid wieder, welches als Grundbaustein des erfindungsgemäßen Polysaccharides anzusehen ist und durch n-fache Aneinanderreihung des Grundbausteins das Polysaccharid ergibt. Dieser aus zwei Zuckermolekülen aufgebaute Grundbaustein soll nicht dahingehend ausgelegt werden, daß unter die allgemeinen Formeln Ia und Ib nur Polysaccharide mit einer geraden Anzahl an Zuckermolekülen fallen. Natürlich umfaßt die allgemeine Formel Ia sowie die Formel Ib auch Polysaccharide mit einer ungeraden Anzahl an Zuckerbausteinen. Als Endgruppen der Oligo- bzw. Polysaccharide liegen Hydroxygruppen vor.

[0010] Die Reste Y und Z repräsentieren unabhängig voneinander die folgenden chemischen Acyl- oder Carboxyalkylgruppen:

-CHO, -COCH₃, -COC₂H₅, -COC₃H₇, -COC₄H₉, -COC₅H₁₁, -COCH(CH₃)₂, -COCH₂CH(CH₃)₂, -COCH(CH₃)C₂H₅, -COC(CH₃)₃, -CH₂COO⁻, -C₂H₄COO⁻, -C₃H₆COO⁻, -C₄H₈COO⁻.

[0011] Bevorzugt sind die Acylreste -COCH₃, -COC₂H₅, -COC₃H₇ sowie die Carboxyalkylreste -CH₂COO⁻, -C₂H₄COO⁻, -C₃H₆COO⁻. Mehr bevorzugt sind Acetyl- und Propanoylgruppe sowie der Carboxymethyl- und Carboxyethylrest. Insbesondere bevorzugt sind die Acetylgruppe und der Carboxymethylrest.

[0012] Zudem ist bevorzugt, wenn der Rest Y eine Acylgruppe und der Rest Z eine Carboxyalkylgruppe repräsentiert. Mehr bevorzugt ist, wenn Y ein Rest -COCH₃, -COC₂H₅ oder -COC₃H₇ und insbesondere -COCH₃ ist. Zudem ist ferner bevorzugt, wenn Z ein Carboxyethyl- oder Carboxymethylrest ist, wobei der Carboxymethylrest insbesondere bevorzugt ist.

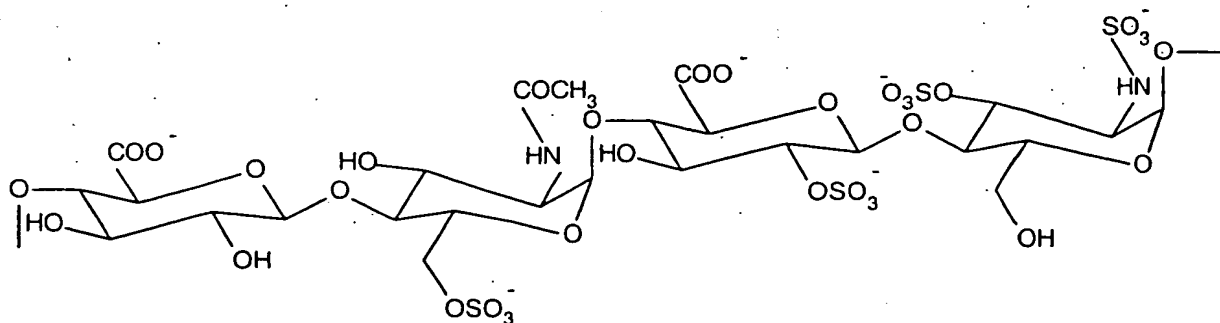
[0013] Der gemäß Formel Ia gezeigte Disaccharidgrundbaustein enthält jeweils einen Substituenten Y und einen weiteren Rest Z. Dies soll verdeutlichen, daß das erfindungsgemäße Polysaccharid zwei verschiedene Reste, nämlich Y und Z enthält. Dabei soll die allgemeine Formel Ia gerade nicht nur Polysaccharide umfassen, welche die Reste Y und Z in streng alternierender Abfolge enthalten, wie sich aus der Aneinanderreihung der Disaccharidgrundbausteine ergeben würde, sondern auch Polysaccharide, welche die Reste Y und Z in vollständig statistischer Abfolge an den Aminogruppen tragen. Ferner soll die allgemeine Formel Ia auch solche Polysaccharide umfassen, die die Reste Y und Z in unterschiedlicher Anzahl enthalten. Verhältnisse zwischen der Anzahl an Resten Y zu der Anzahl an Resten X können zwischen 70% : 30%, bevorzugt zwischen 60% : 40% und besonders bevorzugt zwischen 45% : 55% liegen. Insbesondere bevorzugt sind derartige Polysaccharide der allgemeinen Formel Ia, welche im wesentlichen an der Hälfte der Aminogruppen den Rest Y und an der anderen Hälfte der Aminogruppen den Rest Z in einer rein statistischen Verteilung tragen. Der Begriff "im wesentlichen die Hälfte" bedeutet im Idealfall exakt 50%, soll jedoch den Bereich von 45% bis 55% mit umfassen.

[0014] Da die Polysaccharide der allgemeinen Formeln Ia und Ib Carboxylatgruppen und Aminogruppen enthalten, umfassen die allgemeinen Formeln Ia und Ib auch Alkali- sowie Erdalkalimetallsalze der entsprechenden Polysaccharide. So können Alkalimetallsalze wie das Natriumsalz, das Kaliumsalz, das Lithiumsalz oder Erdalkalimetallsalze wie beispielsweise das Magnesiumsalz oder das Calciumsalz genannt werden. Ferner können mit Ammoniak, primären, sekundären, tertiären und quaternären Aminen, Pyridin und Pyridinderivaten Ammoniumsalze, bevorzugt Alkylammoniumsalze und Pyridiniumsalze gebildet werden. Zu den Basen, welche mit den Polysacchariden Salze bilden, zählen anorganische und organische Basen wie beispielsweise NaOH, KOH, LiOH, CaCO₃, Fe(OH)₃, NH₄OH, Tetraalkylammoniumhydroxide und ähnliche Verbindungen.

[0015] Die vorliegende Erfindung bezieht sich des weiteren auf Verfahren zur Herstellung der Polysaccharide. Als Ausgangsstoffe können Heparin, Heparansulfate, Chitin als auch Chitosan eingesetzt werden. Bei diesen vier Edukten handelt es sich um strukturell sehr ähnliche Verbindungen.

[0016] Heparansulfate kommen ubiquitär auf Zelloberflächen von Säugetieren vor. Von Zelltyp zu Zelltyp unterscheiden sie sich stark in Molekulargewicht, Acetylierungsgrad und Sulfatierungsgrad. Leberheparansulfat weist beispielsweise einen Acetylierungsgrad von ca. 50% auf, wohingegen das Heparansulfat aus der Glykokalix von Endothelzellen einen Acetylierungsgrad von bis zu 90% und größer aufweisen kann. Heparin weist nur einen sehr geringen Acetylierungsgrad von bis zu 5% auf. Der Sulfatierungsgrad liegt beim Leberheparansulfat und Heparin bei ~2 pro Disaccharideinheit, bei Endothelzellheparansulfat nahe bei 0 und bei Heparansulfaten aus anderen Zelltypen zwischen 0 und 2 pro Disaccharideinheit.

[0017] Die folgende Abbildung zeigt eine Tetrasaccharideinheit eines Heparins oder Heparansulfates mit statistischer Verteilung der Sulfatgruppen und einem Sulfatierungsgrad von 2 pro Disaccharideinheit wie er für Heparin typisch ist:



[0018] Allen Heparansulfaten ist mit Heparin der Ablauf der Biosynthese gemeinsam. Dabei wird als erstes das Coreprotein mit der Xylose-haltigen Bindungsregion aufgebaut. Sie besteht aus der Xylose und zwei damit verbundenen Galactoseresten. An den letzten der beiden Galactosereste wird dann abwechselnd je eine Glucuronsäure und ein Galacto-

samin gebunden, bis die entsprechende Kettenlänge erreicht ist. Abschließend erfolgt eine mehrstufige enzymatische Modifizierung dieses gemeinsamen Vorläufer-Polysaccharides aller Heparansulfate und des Heparins durch Sulfotransferasen und Epimerasen, die durch ihre unterschiedlich vollständigen Umsetzungen das breite Spektrum an verschiedenen Heparansulfaten bis hin zum Heparin generieren.

5 [0019] Heparin ist alternierend aus D-Glucosamin und D-Glucuronsäure aufgebaut, wobei D-Glucosamin und D-Glucuronsäure β -1,4-glykosidisch zum Disaccharid verknüpft sind, welches die Heparinuntereinheiten bildet. Diese Unter-
einheiten sind wiederum miteinander β -1,4-glykosidisch verknüpft und führen zum Heparin. Die Stellung der Sulfonyl-
gruppen kann wechseln. Eine Tetrasaccharideinheit enthält durchschnittlich 4 bis 5 Schwefelsäurereste. Heparansulfat,
auch bezeichnet als Heparitinsulfat, enthält mit Ausnahme des Leberheparansulfates weniger N- und O-gebundene Sul-
fonylgruppen als Heparin, dafür aber mehr N-Acetylgruppen.

10 [0020] Wie aus Fig. 3 deutlich wird, sind die Verbindungen der allgemeinen Formel Ia (s. Fig. 3c) und die Verbindun-
gen der allgemeinen Formel Ib (s. Fig. 3b) dem natürlichen Heparansulfat der Endothelzellen strukturell sehr ähnlich und
imitieren daher bestens die Eigenschaften des Endothelzell-Heparansulfates, insbesondere die hemokompatiblen Eigen-
schaften. Damit sind die erfindungsgemäßen Verbindungen gemäß Formel Ia und Ib dazu prädestiniert, anstelle von na-
türlichem Endothelzell-Heparansulfat verwendet zu werden und Oberflächen, welche mit diesen Verbindungen be-
schichtet sind, die Eigenschaften von Endothelzelloberflächen zu verleihen.

15 [0021] Die erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel Ib können aus Heparin oder Heparansulfaten
hergestellt werden, indem zuerst das Polysaccharid im wesentlichen vollständig desulfatiert und danach im wesentlichen
vollständig N-acyliert wird. Der Begriff "im wesentlichen vollständig desulfatiert" steht für einen Desulfatierungsgrad
von größer 90%, bevorzugt größer 95% und besonders bevorzugt größer 98%. Der Desulfatierungsgrad kann gemäß dem
sogenannten Ninhydrintest bestimmt werden, der freie Aminogruppen nachweist. Die Desulfatierung erfolgt in dem
Maße, daß mit DMMB (Dimethylmethylenblau) keine Farbreaktion mehr erhalten wird. Dieser Farbtest ist zum Nach-
weis sulfatierter Polysaccharide geeignet, seine Nachweisgrenze ist in der Fachliteratur jedoch nicht bekannt. Die Desul-
fatierung kann beispielsweise durch Erhitzen des Pyridiniumsalzes in einem Lösungsmittelgemisch durchgeführt wer-
den. Insbesondere hat sich eine Mischung von DMSO, 1,4-Dioxan und Methanol bewährt.

20 [0022] Im wesentlichen vollständig N-acyliert bezieht sich auf einen N-Acylierungsgrad von größer 94%, bevorzugt
größer 97% und besonders bevorzugt größer 98%. Die Acylierung verläuft derart vollständig, daß mit dem Ninhydrin-
nachweis auf freie Aminogruppen keine Farbreaktion mehr erhalten wird. Als Acylierungsmittel werden bevorzugt Car-
bonsäurechloride, -bromide oder -anhydride eingesetzt. Essigsäureanhydrid, Propionsäureanhydrid, Buttersäureanhy-
drid, Essigsäurechlorid, Propionsäurechlorid oder Buttersäurechlorid eignen sich beispielsweise zur Herstellung der er-
findungsgemäßen Verbindungen. Insbesondere eignen sich Carbonsäureanhydride.

30 [0023] Als Lösungsmittel insbesondere für die Carbonsäureanhydride wird deionisiertes Wasser verwendet, bevorzugt
zusammen mit einem Cosolvens, welches in einer Menge von 10 bis 30 Volumenprozent beigesetzt wird. Als Cosolven-
ten eignen sich Methanol, Ethanol, DMSO, DMF, Aceton, Dioxan, THF, Essigsäureethylester und andere polare Lö-
sungsmittel. Bei der Verwendung von Carbonsäurehalogeniden werden bevorzugt polare wasserfreie Lösungsmittel wie
DMSO oder DMF eingesetzt.

35 [0024] Die erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel Ia weisen an der Hälfte der Zuckermoleküle
eine Carboxylatgruppe und an der anderen Hälfte eine N-Acylgruppe auf. Derartige Verbindungen lassen sich auch aus
Chitin oder Chitosan herstellen.

40 [0025] Chitin ist ein stickstoffhaltiges Polysaccharid, dessen monomere Einheiten aus N-Acetyl-D-Glucosamin beste-
hen, welche β -1,4-glykosidisch verknüpft sind. Dadurch ergeben sich lineare Polymere, die aus ca. 2000 Zuckerbauste-
inen bestehen und ein Molekulargewicht von ca. 400 000 g/mol aufweisen.

[0026] Chitin weist eine sehr schlechte Löslichkeit auf und ist in Wasser, organischen Lösungsmitteln sowie verdün-
nten Säuren oder verdünnten Laugen fast unlöslich. Ein Versetzen mit starken Säuren führt zu einer Hydrolyse, bei der D-
Glucosamin und Essigsäure entstehen. Die Behandlung mit starken Laugen führt hingegen zu Chitosan und Acetat.

45 [0027] Chitosan kann leicht durch Verseifung von Chitin gewonnen werden. Chitosan besteht aus β -1,4-glykosidisch
verknüpftem Glucosamin (2-Amino-2-deoxy-D-glucose). Chitosan ist aufgrund seiner Filmbildungseigenschaften be-
kannt und wird zudem als Basismaterial für Ionentauscher und als Mittel zur Senkung des Cholesterinspiegels im Blut-
serum und zur Gewichtsreduktion eingesetzt.

50 [0028] Die erfindungsgemäßen Substanzen der allgemeinen Formel Ia können aus Chitin hergestellt werden, indem
Chitin mittels starker Basen teilweise deacetyliert wird und danach die freien Aminogruppen monocarboxyalkyliert wer-
den (s. Fig. 1). Der Deacetylierungsgrad, d. h. die Menge an demaskierten primären Aminogruppen kann volumetrisch
bestimmt werden. Der quantitative Nachweis der freien Aminogruppen erfolgt mittels Ninhydrinreaktion. Je nach Ver-
suchsdurchführung können Deacetylierungsgrade von 20 bis 80% erhalten werden. Bevorzugt sind Deacetylierungs-
grade von 40 bis 60%, insbesondere bevorzugt sind 45 bis 55%.

55 [0029] Auf diesem Syntheseweg sind Polysaccharide erhältlich, deren Zuckerbausteine entweder eine N-Acetylgruppe
oder eine N-Carboxyalkylgruppe in rein statistischer Verteilung enthalten.

[0030] Chitosan, welches durch basische Hydrolyse der N-Acetylgruppen des Chitins leicht zugänglich ist (s. Fig. 1),
dient gleichermaßen als Ausgangsmaterial zur Synthese der Polysaccharide gemäß Formel Ia.

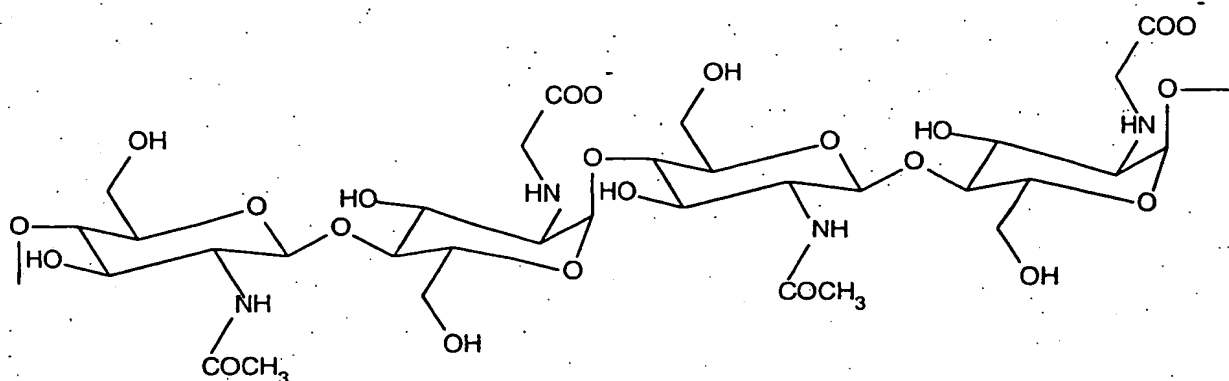
60 [0031] Chitosan besitzt nur sehr wenige N-Acetylgruppen. Somit können die erfindungsgemäßen Verbindungen zum
einen dadurch erhalten werden, daß im wesentlichen die Hälfte der freien Aminogruppen in einem ersten Schritt car-
boxyalkyliert werden und danach die verbleibenden freien Aminogruppen acyliert werden, oder man zuerst die Acylie-
rung durchführt und danach die verbleibenden freien Aminogruppen mit einem geeigneten Carboxyalkylierungsmittel
umsetzt. Bevorzugt ist, wenn im wesentlichen die Hälfte der Aminogruppen acyliert und die verbleibende Hälfte car-
boxyalkyliert wird.

65 [0032] Unter partiell N-acyliertem Chitosan wird ein N-Acylierungsgrad von 30–70%, bevorzugt von 40–60% und be-
sonders bevorzugt von 45–55% verstanden. Insbesondere bevorzugt sind Chitosanderivate, welche im wesentlichen an
der Hälfte der Aminogruppen den Rest Y und an der anderen Hälfte der Aminogruppen den Rest Z in einer rein statisti-

schen Verteilung tragen. Der Begriff "im wesentlichen die Hälfte" bedeutet im Idealfall exakt 50%, soll jedoch den Bereich von 45% bis 55% mit umfassen. Der Carboxyalkylierungs- und Acylierungsgrad lassen sich beispielsweise mittels ^{13}C -NMR bestimmen (Fehlertoleranz $\pm 3\%$).

[0033] Aufgrund der Tatsache, daß in einem ersten Reaktionsschritt eine bestimmte Anzahl der freien Aminogruppen acyliert oder carboxyalkyliert wird, ergibt sich dadurch zwangsläufig eine vollständig statistische Verteilung der Acylreste bzw. Carboxyalkylreste in dem Polysaccharid der allgemeinen Formel Ia. Die Formel Ia soll daher nur einen Disaccharidbaustein des erfindungsgemäßen Polysaccharides wiedergeben, nicht aber eine alternierende Abfolge der Acylgruppen und Carboxyalkylgruppen festlegen.

[0034] Die folgende Abbildung zeigt eine typische Tetrasaccharideinheit eines N-carboxymethylierten, N-acetylierten Chitosans:



[0035] Die vorliegende Erfindung beschreibt die Verwendung der Verbindungen der allgemeinen Formel Ia und/oder Ib sowie Salze dieser Verbindungen für die Beschichtung, insbesondere eine hämokompatible Beschichtung von natürlichen und/oder künstlichen Oberflächen. Unter "hämokompatibel" wird die fehlende thrombotische Eigenschaft der erfindungsgemäßen Verbindungen verstanden, nicht mit den Stoffen des Blutgerinnungssystems oder den Blutplättchen wechselzuwirken und daher nicht die Blutgerinnungskaskade auszulösen.

[0036] Zudem offenbart die Erfindung Oligo- und/oder Polysacchariden für die hämokompatible Beschichtung von Oberflächen. Bevorzugt sind Polysaccharide innerhalb der oben genannten Molekulargewichtsgrenzen. Die verwendeten Oligo- und/oder Polysaccharide zeichnen sich dadurch aus, daß sie den Zuckerbaustein N-Acetylglucosamin in großer Menge enthalten. Dies bedeutet, daß 40 bis 60% der Zuckerbausteine N-Acetylglucosamin sind und im wesentlichen die restlichen Zuckerbausteine jeweils einen Carboxylrest aufweisen. Die Oligo- und/oder Polysaccharide bestehen somit gewöhnlich zu über 95%, bevorzugt zu über 98%, aus nur zwei Zuckerbausteinen, wobei ein Zuckerbaustein einen Carboxylrest und der andere einen N-Acylrest trägt.

[0037] Ein Zuckerbaustein der Oligo- und/oder Polysaccharide ist N-Acetylglucosamin, bevorzugt N-Acetylglucosamin, und bei dem anderen handelt es sich um Uronsäure, bevorzugt um Glucuronsäure.

[0038] Bevorzugt sind Oligo- und/oder Polysaccharide, welche im wesentlichen aus dem Zucker Glucosamin bestehen, wobei im wesentlichen die Hälfte der Zuckerbausteine eine N-Acylgruppe trägt, bevorzugt eine N-Acetylgruppe, und die andere Hälfte der Glucosaminbausteine eine über die Aminogruppe direkt oder über eine oder mehrere Methylengruppen gebundene Carboxylgruppe trägt. Bei diesen an die Aminogruppe gebundenen Carbonsäurereste handelt es sich bevorzugt um Carboxymethyl- oder Carboxyethylgruppen. Ferner sind Oligo- und/oder Polysaccharide bevorzugt, welche im wesentlichen zur Hälfte aus N-Acetylglucosamin, bevorzugt aus N-Acetylglucosamin, und im wesentlichen zur anderen Hälfte aus einer Uronsäure, bevorzugt Glucuronsäure, bestehen. Besonders bevorzugt sind die Oligo- und/oder Polysaccharide, welche eine im wesentlichen alternierende Abfolge der beiden Zuckerbausteine aufweisen.

[0039] Überraschenderweise hat sich gezeigt, daß sich für die erfindungsgemäßen Verwendungen insbesondere im wesentlichen desulfatiertes und im wesentlichen N-acyliertes Heparin sowie partiell N-carboxyalkyliertes und N-acyliertes Chitosan besonders gut eignen. Insbesondere sind für die hämokompatible Beschichtung N-acetyliertes Heparin sowie partiell N-carboxymethyliertes und N-acetyliertes Chitosan geeignet.

[0040] Der Begriff "im wesentlichen" soll verdeutlichen, daß statistische Abweichungen zu berücksichtigen sind. Eine im wesentlichen alternierende Abfolge der Zuckerbausteine besagt, daß in der Regel keine zwei gleichen Zuckerbausteine aneinander gebunden sind, schließt aber eine derartige Fehlverknüpfung nicht vollkommen aus. Entsprechend bedeutet "im wesentlichen zur Hälfte" annähernd 50%, läßt aber geringe Schwankungen zu, da gerade bei biosynthetisch hergestellten Makromolekülen nie der Idealfall erreicht wird und immer gewisse Abweichungen berücksichtigt werden müssen, da Enzyme nicht perfekt arbeiten und bei der Katalyse mit einer gewissen Fehlerrate zu rechnen ist. Im Falle des natürlichen Heparins liegt hingegen eine streng alternierende Abfolge von N-Acetylglucosamin- und Glucuronsäureeinheiten vor.

[0041] Des weiteren wird ein Verfahren zur hämokompatiblen Beschichtung von Oberflächen offenbart, welche für den direkten Blutkontakt bestimmt sind. Bei diesem Verfahren wird eine natürliche und/oder künstliche Oberfläche bereitgestellt und die oben beschriebenen Oligo- und/oder Polysaccharide werden auf dieser Oberfläche immobilisiert.

[0042] Dabei können beliebige natürliche und/oder künstliche Oberflächen eingesetzt werden, beispielsweise Oberflächen von Organen, Gefäßen, Aorten, Herzklappen, Schläuchen, Organersatzteilen, Implantaten, Fasern, Hohlfasern, Stents, Kanülen, Spritzen, Membranen, Konserven, Blutbehältern, Titerplatten, Herzschrittmachern sowie andere Oberflächen, welche für den direkten Blutkontakt hämokompatible Eigenschaften aufweisen sollen. Insbesondere werden Stents erfindungsgemäß beschichtet.

[0043] Zudem können gemäß dem beschriebenen Verfahren beliebige Kunststoffoberflächen mit einer hämokompatiblen Schicht der Oligo- und/oder Polysaccharide überzogen werden. Als Kunststoffe eignen sich synthetische Polymere sowie Biopolymere, beispielsweise zusammengesetzt aus den Monomeren Ethen, Vinylacetat, Methacrylsäure, Vinylcarbazol, Trifluorethylen, Propen, Buten, Methylpenten, Isobuten, Styrol, Chlorstyrol, Aminostyrol, Acrylnitril, Butadien, Acrylester, Divinylbenzol, Isopren, Vinylchlorid, Vinylalkohol, Vinylpyridin, Vinylpyrrolidon, Tetrafluorethen, Trifluorchlorethen, Vinylfluorid, Hexafluorisobuten, Acrylsäure Acrolein, Acrylamid, Methacrylamid, Maleinsäure, Hydroxymethylmethacrylsäure, Methylmethacrylsäure, Maleinsäureanhydrid, Methacrylsäureanhydrid, Methacrylnitril, Fluorstyrol, Fluoranilid, 3,4-Isothiocyanatostyrol, Allylalkohol, Sulfonsäure, Methacrylsäure, Diallylphthalsäure, Cyanoacrylsäure, Dimethylaminoethylmethacrylsäure, Laurylmethacrylsäure, Acetaminophenylethoxymethacrylsäure, Glykoldimethacrylsäure, 2-Hydroxyethylmethacrylsäure, Formaldehyd, Fluoral, Chloral, Ethylenoxid, Tetrahydrofuran, Propylenoxid, Allylglycidylether, Epichlorhydrin, Glycerin, Trimethylpropan, Pentaerythrit, Sorbit, Phthalsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Adipinsäure, thiophen, Ethylenimin, Hexamethylenadipamid, Hexamethylensebacamid, Hexamethylendodecandiamid, Aminobenzamid, Phenylendiamin, Amidhydrazide, Dimethylpiperazin, Benzimidazol, Tetraaminobenzol, Pyrone, ϵ -Caprolactam, Isophthalsäure, Glutaminsäure, Leucin, Phenylalanin, Valin, Lysin, Harnstoff, Diisocyanate, Thioharnstoff und anderen oder Gemische aus den vorgenannten Monomeren. Ferner kommen als Polymere in Betracht: Silicone, Cellulose und Cellulosederivate, Öle, Polycarbonate, Polyurethane, Agarose, Polysaccharide, Dextrane, Stärke, Chitin, Glykosaminoglykane, Gelatine, Kollagen I–XII und andere Proteine.

[0044] Die Immobilisierung der Oligo- und/oder Polysaccharide auf diesen Oberflächen kann mittels hydrophober Wechselwirkungen, von der Waals Kräften, elektrostatischer Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, ionischer Wechselwirkungen, Quervernetzung der Oligo- und/oder Polysaccharide und/oder durch kovalente Bindung an die Oberfläche bewirkt werden. Bevorzugt ist die kovalente Verknüpfung der Oligo- und/oder Polysaccharide (side-on Bindung), mehr bevorzugt die kovalente Einzelpunktverknüpfung und insbesondere bevorzugt die kovalente Endpunktverknüpfung (end-on Bindung).

[0045] Die natürlichen und/oder künstlichen Oberflächen, welche nach dem oben beschriebenen Verfahren mit einer hämokompatiblen Schicht der erfindungsgemäßen Oligo- und/oder Polysaccharide überzogen worden sind, eignen sich insbesondere als Implantate bzw. Organersatzteile, welche in direktem Kontakt mit dem Blutkreislauf und Blut stehen.

[0046] Ferner ist überraschenderweise gefunden worden, daß derartig beschichtete Oberflächen die Anhaftung von Proteinen verhindert oder verringert. Dies ist beispielsweise wichtig bei der in vitro Diagnostik aus Körperflüssigkeiten. Somit verhindert oder zumindest verringert das Aufbringen der erfindungsgemäßen Beschichtung beispielsweise auf Mikrotiterplatten oder anderen Trägermedien, welche für diagnostische Nachweisverfahren eingesetzt werden, die unspezifische Ablagerung von Proteinen, welche die in der Regel empfindlichen Nachweisreaktionen stören und zu einer Verfälschung des Analyseergebnisses führen können.

[0047] Durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Beschichtung auf Adsorbermedien oder Chromatographiemedien wird ebenfalls die unspezifische Ablagerung von Proteinen verhindert oder verringert, wodurch bessere Trennungen erreicht werden und Produkte von größerer Reinheit gewonnen werden können.

Figurenbeschreibung

[0048] Fig. 1 zeigt ein Disaccharidstrukturfragment des Chitins, welches durch basische Hydrolyse zum Chitosan oder durch partielle Deacetylierung mit anschließender N-Carboxyalkylierung zu den Verbindungen der allgemeinen Formel Ia umgesetzt werden kann.

[0049] Fig. 2 zeigt ein Disaccharidstrukturfragment des Chitosans, welches durch partielle N-Acylierung mit anschließender N-Carboxyalkylierung oder durch partielle N-Carboxyalkylierung mit anschließender N-Acylierung zu den Verbindungen der allgemeinen Formel Ia umgesetzt werden kann.

[0050] Fig. 3 zeigt eine Tetrasaccharideinheit eines Heparins oder Heparansulfates mit statistischer Verteilung der Sulfatgruppen und einem Sulfatierungsgrad von 2 pro Disaccharideinheit wie er für Heparin typisch ist (Fig. 3a). Zum Vergleich zeigt Fig. 3b einen Ausschnitt mit typischer Struktur für ein Endothelzellheparansulfat, das gemeinsame biosynthetische Vorläufermolekül von Heparin und allen Heparansulfaten und Fig. 3c zeigt einen Ausschnitt mit typischer Struktur für N-carboxymethyliertes, partiell N-acetyliertes Chitosan.

Beispiele

Beispiel 1

Herstellung von desulfatiertem reacctyliertem Heparin

[0051] 100 ml Amberlite IR-122 Kationenaustauscherharz wurden in eine Säule mit 2 cm Durchmesser gefüllt, mit 400 ml 3M HCl in die H⁺-Form überführt und mit destilliertem Wasser gespült, bis das Eluat chloridfrei und pH neutral war. 1 g Natrium-Heparin wurde in 10 ml Wasser gelöst, auf die Kationenaustauschersäule gegeben und mit 400 ml Wasser eluiert. Das Eluat wurde in eine Vorlage mit 0,7 g Pyridin getropft und anschließend mit Pyridin auf pH 6 titriert und gefriergetrocknet.

[0052] 0,9 g Heparin-Pyridinium-Salz wurden in einem Rundkolben mit Rückflußkühler mit 90 ml einer 6/3/1 Mischung aus DMSO/1,4-Dioxan/Methanol (V/V/V) versetzt und 24 Stunden auf 90°C erhitzt. Dann wurden 823 mg Pyridiniumchlorid zugegeben und weitere 70 Stunden auf 90°C erhitzt. Anschließend wurde mit 100 ml Wasser verdünnt und mit verdünnter Natronlauge auf pH 9 titriert. Das desulfatierte Heparin wurde gegen Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

[0053] 100 mg des desulfatierten Heparins wurden in 10 ml Wasser gelöst, auf 0°C gekühlt und unter Rühren mit 1,5 ml Methanol versetzt. Zu der Lösung wurden 4 ml Dowex 1x4 Anionenaustauscherharz in der OH⁻-Form und an-

schließend 150 µl Essigsäureanhydrid gegeben und 2 Stunden bei 4°C gerührt. Danach wird das Harz abfiltriert und die Lösung gegen Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

Beispiel 2

N-carboxymethyliertes, partiell N-acetyliertes Chitosan

[0054] In 150 ml 0,1 N HCl wurde 2 g Chitosan gelöst und unter Stickstoff 24 Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der pH der Lösung mit 2 N NaOH auf 5,8 eingestellt. Die Lösung wurde gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

[0055] 1 g des so partiell hydrolysierten Chitosans wurden in 100 ml 1%iger Essigsäure gelöst. Nach hinzufügen von 100 ml Methanol wurden 605 µl Essigsäureanhydrid gelöst in 30 ml Methanol zugegeben und 40 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde durch Eingießen in eine Mischung von 140 ml Methanol und 60 ml 25%iger NH₃-Lösung ausgefällt. Es wurde abfiltriert, mit Methanol und Diethylether gewaschen und unter Vakuum über Nacht getrocknet.

[0056] 1 g des partiell hydrolysierten und partiell N-acetylierten Chitosans wurde in 50 ml Wasser suspendiert. Nach dem Hinzufügen von 0,57 g Glyoxylsäuremonohydrat löste sich das Chitosanderivat innerhalb der nächsten 45 Minuten auf. Der pH Wert der Lösung wurde mit 2 N NaOH auf 12 eingestellt. Eine Lösung von 0,4 g Natriumcyanoborhydrid in möglichst wenig Wasser wurde zugegeben und für 45 Minuten gerührt. Das Produkt wurde in 400 ml Ethanol ausgefällt, abfiltriert, mit Ethanol gewaschen und über Nacht im Vakuum getrocknet.

Beispiel 3

Immobilisierung auf Silikon

[0057] Durch einen 1 m langen Silikonschlauch mit 3 mm Innendurchmesser wurde 30 Minuten lang bei 40°C 100 ml eines Gemisches aus Ethanol/Wasser 1/1 (V/V) im Kreis gepumpt. Dann wurden 2 ml 3-(Triethoxysilyl)-propylamin zugegeben und weitere 15 Stunden bei 40°C im Kreis gepumpt. Danach wurde noch jeweils 2 Stunden mit 100 ml Ethanol/Wasser und 100 ml Wasser gespült.

[0058] 3 mg des deacetylierten und reacctylierten Heparins wurden bei 4°C in 30 ml 0,1 M MES-Puffer pH 4,75 gelöst und mit 30 mg CME-CDI (N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)carbodiimidmethyl-p-toluolsulfonat) versetzt. Diese Lösung wurde für 15 Stunden bei 4°C im Kreis durch den Schlauch gepumpt. Anschließend wurde mit Wasser, 4 M NaCl-Lösung und Wasser für je 2 Stunden gespült.

Beispiel 4

Thrombozytenzahl (EN30993-4)

[0059] Auf einen 1 m langen Silikonschlauch mit 3 mm Innendurchmesser wurden zwei 2 cm lange enganliegende Glasröhrchen geschoben. Dann wurde der Schlauch mit einem Schrumpfschlauch zu einem Kreis geschlossen und luftfrei über Spritzen mit 0,154 M NaCl Lösung gefüllt. Dabei wurde mit einer Spritze die Lösung eingefüllt und mit der anderen Spritze die Luft herausgezogen. Mit den beiden Spritzen wurde die Lösung luftblasenfrei gegen citriertes Vollblut eines gesunden Probanden ausgetauscht. Danach wurden die Einstichlöcher der Injektionsnadeln durch Überschieben der Glasröhrchen verschlossen und der Schlauch in eine Dialysepumpe gespannt. Das Blut wurde 10 Minuten mit einer Flußrate von 150 ml/min ungepumpt. Der Thrombozytengehalt des Blutes wurde vor und nach der Perfusion mit einem Coulter Counter bestimmt. Für unbeschichtete Silikonschläuche lag der Thrombozytenverlust bei 10%. Dagegen lag er bei Silikonschläuchen, die nach Beispiel 3 beschichtet wurden, im Durchschnitt bei 0% (Anzahl der Versuche: n = 3).

Beispiel 5

Herstellung von desulfatiertem N-propionyliertem Heparin

[0060] 100 ml Amberlite IR-122 Kationenaustauscherharz wurden in eine Säule mit 2 cm Durchmesser gefüllt, mit 400 ml 3 M HCl in die H⁺-Form überführt und mit destilliertem Wasser gespült, bis das Eluat chloridfrei und pH neutral war. 1 g Natrium-Heparin wurde in 10 ml Wasser gelöst, auf die Kationenaustauschersäule gegeben und mit 400 ml Wasser eluiert. Das Eluat wurde in eine Vorlage mit 0,7 g Pyridin getropft und anschließend mit Pyridin auf pH 6 titriert und gefriergetrocknet.

[0061] 0,9 g Heparin-Pyridinium-Salz wurden in einem Rundkolben mit Rückflußkühler mit 90 ml einer 6/3/1 Mischung aus DMSO/1,4-Dioxan/Methanol (V/V/V) versetzt und 24 Stunden auf 90°C erhitzt. Dann wurden 823 mg Pyridiniumchlorid zugegeben und weitere 70 Stunden auf 90°C erhitzt. Anschließend wurde mit 100 ml Wasser verdünnt und mit verdünnter Natronlauge auf pH 9 titriert. Das desulfatierte Heparin wurde gegen Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

[0062] 100 mg des desulfatierten Heparins wurden in 10 ml Wasser gelöst, auf 0°C gekühlt und unter Rühren mit 1,5 ml Methanol versetzt. Zu der Lösung wurden 4 ml Dowex 1x4 Anionenaustauscherharz in der OH⁻-Form und anschließend 192 µl Propionsäureanhydrid gegeben und 2 Stunden bei 4°C gerührt. Danach wird das Harz abfiltriert und die Lösung gegen Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

N-carboxymethyliertes, partiell N-propionyliertes Chitosan

5 [0063] In 150 ml 0,1 N HCl wurde 2 g Chitosan gelöst und unter Stickstoff 24 Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der pH der Lösung mit 2 N NaOH auf 5,8 eingestellt. Die Lösung wurde gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

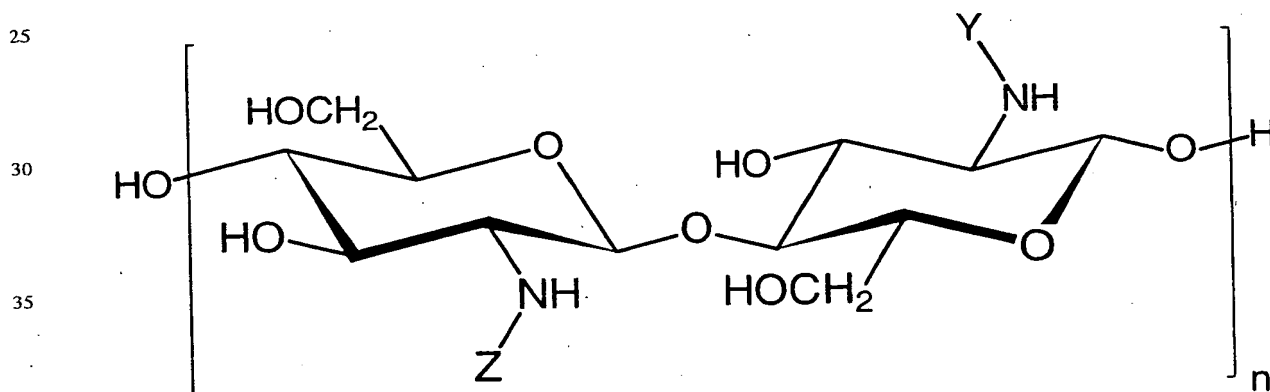
10 [0064] 1 g des so partiell hydrolysierten Chitosans wurden in 100 ml 1%iger Essigsäure gelöst. Nach hinzufügen von 100 ml Methanol wurden 772 µl Propionsäureanhydrid gelöst in 30 ml Methanol zugegeben und 40 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde durch Eingießen in eine Mischung von 140 ml Methanol und 60 ml 25%iger NH₃-Lösung ausgefällt. Es wurde abfiltriert, mit Methanol und Diethylether gewaschen und unter Vakuum über Nacht getrocknet.

15 [0065] 1 g des partiell hydrolysierten und partiell N-acetylierten Chitosans wurde in 50 ml Wasser suspendiert. Nach dem Hinzufügen von 0,57 g Glyoxylsäuremonohydrat löste sich das Chitosanderivat innerhalb der nächsten 45 Minuten auf. Der pH Wert der Lösung wurde mit 2 N NaOH auf 12 eingestellt. Eine Lösung von 0,4 g Natriumcyanoborhydrid in möglichst wenig Wasser wurde zugegeben und für 45 Minuten gerührt. Das Produkt wurde in 400 ml Ethanol ausgefällt, abfiltriert, mit Ethanol gewaschen und über Nacht im Vakuum getrocknet.

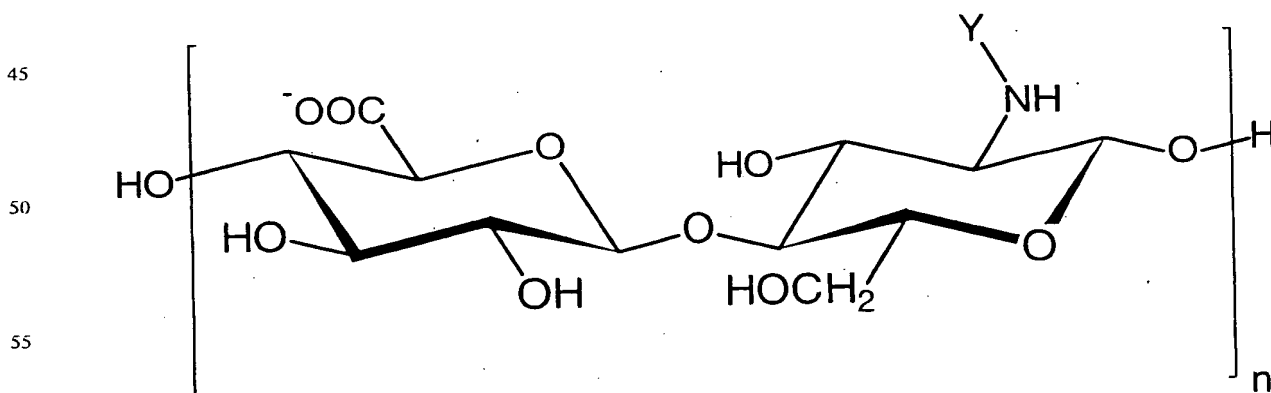
Patentansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Formel Ia und Ib

Formel Ia



Formel Ib



60 worin

n eine ganze Zahl zwischen 4 und 1050 bedeutet,

Y und Z unabhängig voneinander die Reste -CHO, -COCH₃, -COC₂H₅, -COC₃H₇, -COC₄H₉, -COC₅H₁₁, -COCH(CH₃)₂, -COCH₂CH(CH₃)₂, -COCH(CH₃)C₂H₅, -COC(CH₃)₃, -CH₂COO⁻, -C₂H₄COO⁻, -C₃H₆COO⁻, -C₄H₈COO⁻ darstellen, sowie Salze dieser Verbindungen.

2. Verbindungen der allgemeinen Formel Ia gemäß Anspruch 1, worin Y und Z unabhängig voneinander die Reste -COCH₃, -COC₂H₅, -COC₃H₇, -CH₂COO⁻, -C₂H₄COO⁻, -C₃H₆COO⁻ darstellen, sowie Salze dieser Verbindungen.

3. Verbindungen der allgemeinen Formel Ib gemäß Anspruch 1, worin Y die Reste -COCH₃, -COC₂H₅, -COC₃H₇ darstellt, sowie Salze dieser Verbindungen.

4. Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formel Ia, dadurch gekennzeichnet, daß Heparan-

- sulfat und/oder Heparin im wesentlichen vollständig desulfatiert und anschließend N-acyliert wird.
5. Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formel Ib, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) Chitosan partiell N-carboxyalkyliert und danach N-acyliert wird,
 - b) Chitosan partiell N-acyliert und danach N-carboxyalkyliert wird,
 - c) Chitin partiell deacetyliert und danach N-carboxyalkyliert wird.
 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminogruppen von Chitosan oder Chitin im wesentlichen zur Hälfte acyliert und zur anderen Hälfte carboxyalkyliert werden.
 7. Verwendung der Verbindungen der allgemeinen Formel Ia und/oder Ib zur Beschichtung von Oberflächen.
 8. Verwendung von Oligo- und/oder Polysacchariden zur hämokompatiblen Beschichtung von Oberflächen, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligo- und/oder Polysaccharide zwischen 40% und 60% den Zuckerbaustein N-Acylglucosamin enthalten und im wesentlichen die restlichen Zuckerbausteine einen Carboxylrest pro Zuckerbaustein aufweisen.
 9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß im wesentlichen jeder zweite Zuckerbaustein der Oligo- und/oder Polysaccharide N-Acylglucosamin ist.
 10. Verwendung gemäß Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei N-Acylglucosamin um N-Acetylglucosamin handelt.
 11. Verwendung gemäß Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den restlichen Zuckerbausteinen um Uronsäuren handelt.
 12. Verwendung gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Uronsäuren im wesentlichen um Glucuronsäure handelt.
 13. Verwendung nach einem der Ansprüche 7–12, dadurch gekennzeichnet, daß die Abfolge der Zuckerbausteine im wesentlichen alternierend ist.
 14. Verwendung nach einem der Ansprüche 8–13, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligo- und/oder Polysaccharide im wesentlichen desulfatiertes und im wesentlichen N-acyliertes Heparansulfat sowie partiell N-carboxyalkyliertes und N-acyliertes Chitosan umfassen.
 15. Verfahren zur hämokompatiblen Beschichtung von für den direkten Blutkontakt bestimmte Oberflächen umfassend die folgenden Schritte:
 - a) Bereitstellen einer Oberfläche und
 - b) Immobilisierung der Oligo- und/oder Polysaccharide gemäß einem der Ansprüche 1–14 auf dieser Oberfläche.
 16. Verfahren gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberflächen biologische und künstliche Oberflächen von Organen, Gefäßen, Aorten, Herzklappen, Schläuchen, Organersatzteilen, Implantaten, Fasern, Hohlfasern, Stents, Kanülen, Spritzen, Membranen, Konserven, Blutbehältern, Titerplatten und Herzschrittmachern umfassen.
 17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Immobilisierung der Oligo- und/oder Polysaccharide gemäß einem der Ansprüche 1–14 durch hydrophobe Wechselwirkungen, von der Waals Kräfte, elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, ionische Wechselwirkungen, Quervernetzung und/oder kovalente Bindung erfolgt.
 18. Verwendung der hämokompatibel beschichteten Oberflächen für den direkten Kontakt mit Blut.
 19. Verwendung gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die hämokompatibel beschichtete Oberfläche die Anhaftung von Proteinen verhindert oder verringert.
 20. Verwendung nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß die hämokompatibel beschichtete Oberfläche von Mikrotiterplatten oder anderen Trägermedien für diagnostische Nachweisverfahren die unspezifische Ablagerung von Proteinen verhindert oder verringert.
 21. Verwendung nach einem der Ansprüche 18–20, dadurch gekennzeichnet, daß die hämokompatibel beschichtete Oberfläche von Adsorbermedien oder Chromatographiemedien die unspezifische Ablagerung von Proteinen verhindert oder verringert.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

Figuren

Fig. 1

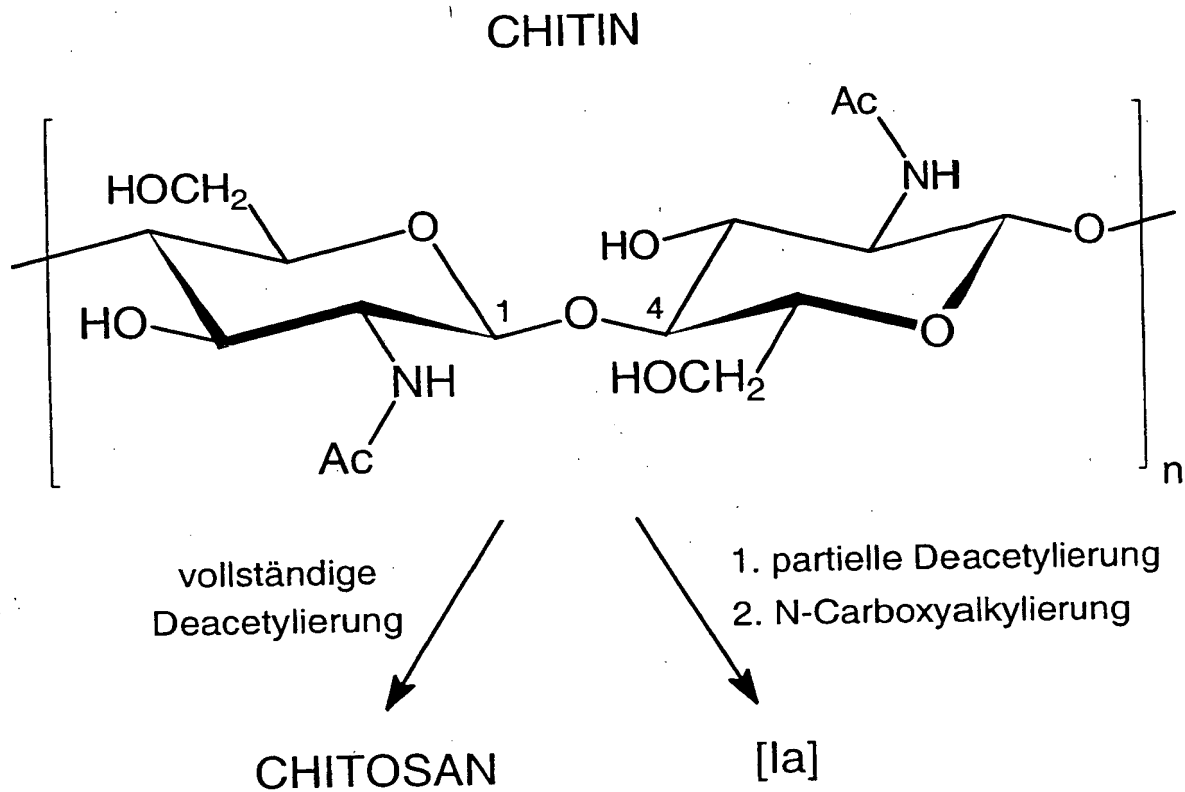
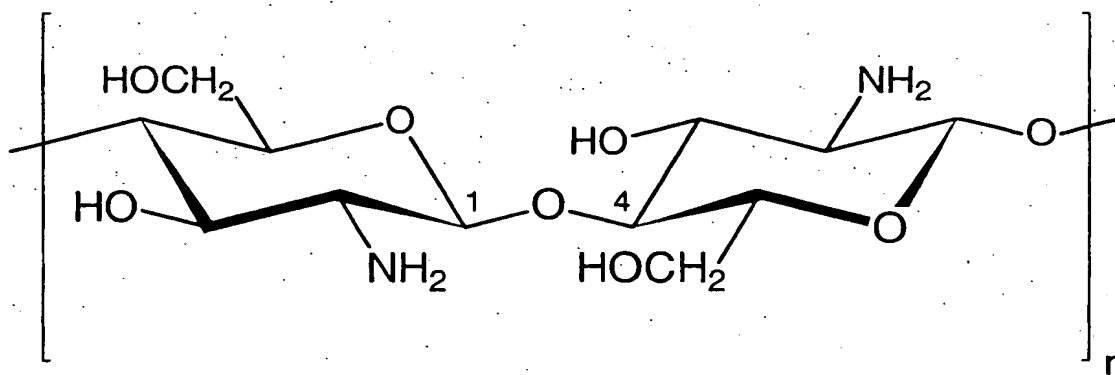


Fig. 2

CHITOSAN



1. partielle N-Acylierung
2. N-Carboxyalkylierung

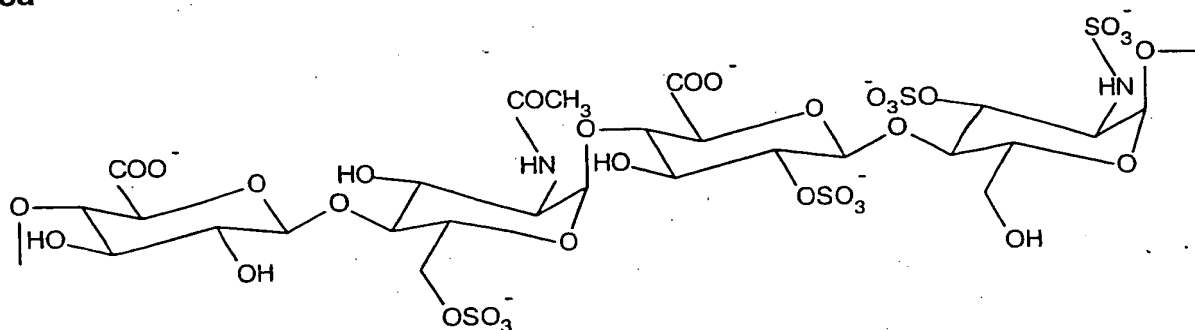
[Ia]

1. partielle N-Carboxyalkylierung
2. N-Acylierung

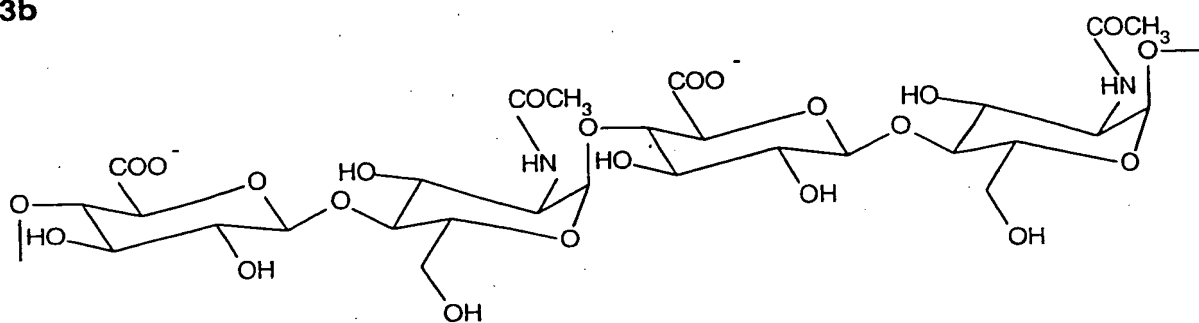
[Ia]

Fig. 3

3a



3b



3c

